

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

10.03.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 3月12日

REC'D 24 JUN 2004

出願番号
Application Number: 特願2003-067173
[ST. 10/C]: [JP2003-067173]

WIPO

PCT

出願人
Applicant(s):

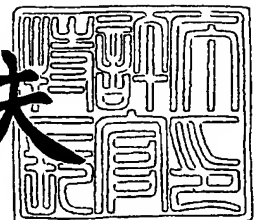
独立行政法人農業生物資源研究所
独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 6月 3日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 MOA-A0211

【提出日】 平成15年 3月12日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 2-1-2 独立行政法人 農業
生物資源研究所内

【氏名】 土岐 精一

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 2-1-2 独立行政法人 農業
生物資源研究所内

【氏名】 市川 裕章

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市松代 5-2-29 つくばアイビースク
エア 502

【氏名】 刑部 敬史

【特許出願人】

【識別番号】 501167644

【氏名又は名称】 独立行政法人農業生物資源研究所

【特許出願人】

【識別番号】 000195568

【氏名又は名称】 生物系特定産業技術研究推進機構

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【その他】 国等以外の全ての者の持分の割合 0 4 8 / 1 0 0

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 部位特異的組換え酵素遺伝子の一過的発現によるマーカー遺伝子の除去技術

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 部位特異的組換え酵素をコードするDNAを、部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAを有する形質転換植物体に、Agrobacteriumを介して導入することにより、該部位特異的組換え酵素を一過的に発現させる工程を含む、該部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAの除去方法。

【請求項 2】 請求項 1 に記載の方法により、部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAが除去された形質転換植物体。

【請求項 3】 トランスポゾン転位酵素をコードするDNAを、トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾン有する形質転換植物体に、Agrobacteriumを介して導入することで、トランスポゾン転位酵素を一過的に発現させる工程を含む、該トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンの転位方法。

【請求項 4】 請求項 3 に記載の方法により、トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンが転位した形質転換植物体。

【請求項 5】 請求項 2 または請求項 4 に記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体。

【請求項 6】 請求項 2、4 または 5 に記載の形質転換植物体の繁殖材料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAを有する形質転換植物体から該DNAを効率的かつ簡便に除去する方法に関する。さらに、本発明は、トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾン有する形質転換植物体から該トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンを効率的かつ簡便に転位する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ゲノムDNA中に挿入されたマーカー遺伝子を除去する方法として、マーカー遺伝子の両端に部位特異的組換え酵素認識配列を配置し、部位特異的組換え酵素によりマーカー遺伝子を切り出し除去することが考案されている。則ち、部位特異的組換え酵素認識配列を付加したマーカー遺伝子を持つ個体と部位特異的組換え酵素遺伝子を導入した個体をかけ合わせるによりマーカー遺伝子の切り出し除去を行う方法（非特許文献1）、予めマーカー遺伝子と誘導性プロモーターによりコントロールされる部位特異的組換えタンパク遺伝子を一緒に部位特異的組換え酵素認識配列の内側に配置し形質転換し、必要な時に部位特異的組換え酵素の発現を誘導することによってマーカー遺伝子の切り出し除去を行う方法（非特許文献2）である。しかしながら上記の2つの方法においては、部位特異的組換え酵素の発現量が充分でなく切り出し除去の効率が極めて低いことが問題点であった。また非特許文献2に記載の方法においては部位特異的組換え酵素の発現を完全に抑制することは現状では困難であり、形質転換処理後、マーカー遺伝子を利用した形質転換体選抜中に、部位特異的組換え酵素の作用により、マーカー遺伝子が抜け落ちる可能性が高い事が問題であった。

【0003】

しかしながら、これまでに、*in planta transformation*法により、部位特異的組換え酵素遺伝子を一過的に高発現させて、マーカー遺伝子を効率的かつ簡便に除去できる方法については知られていなかった。

【0004】

尚、本出願の発明に関連する先行技術文献情報を以下に示す。

【非特許文献1】 Onouchi H et al. Visualization of site-specific recombination catalyzed by a recombinase from *Zygosaccaromyces rouxii* in *Arabidopsis thaliana*. (1995) Mol. Gen. Genet. 247, 653-660

【非特許文献2】 Sugita K et al. A transformation vector for production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency. Plant J. (2000) 22, 461-469

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAを有する形質転換植物体から該DNAを効率的かつ簡便に除去する方法を提供することにある。さらに、本発明は、トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンを持つ形質転換植物体から該トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンを効率的かつ簡便に転位する方法を提供することもまた目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、Ye, G.-N.ら (Guang-Ning Ye et al. (1999) Plant J 19 (3), 249-257.) の論文を精査し、vacuum infiltration法 (in planta transformation 法の一つ) によりGUS遺伝子を導入した場合、一過的にはGUS遺伝子の非常に強い発現がアラビドプシス植物体で観察されることに気がついた。一方、Hodgesらのグループは (Lyznik LA et al. (1993) Nucleic Acids Res 25, 21(4), 969-975.) は形質転換トウモロコシ由来のプロトプラストにおいてFLP遺伝子を一過的に発現させることにより、特異的認識配列であるFRTには含まれた配列の切り出しが行える事を報告していた。

【0007】

そこで本発明者らは、in planta transformation法の一つであるFloral dip法により外来遺伝子が一過的には胚発生の初期に強く発現する事を利用し、部位特異的組換え酵素遺伝子を一過的に高発現させることで、マーカー遺伝子を効率的かつ簡便に除去できるのではないかと考えた。

【0008】

まず、部位特異的組み換えタンパク質として出芽酵母由来のFLP recombinaseを利用し、その認識配列であるFRT配列をハイグロマイシン抵抗性遺伝子カセットの両外側に配置したコンストラクトを作製した。このコンストラクトではFRT配列のさらに外側にはマンノピン合成酵素遺伝子のプロモーターとビアラホス耐性遺伝子を配置した。原理的にFLPによりFRT配列間が除去されればマンノピン合成酵素遺伝子のプロモーターとビアラホス耐性遺伝子が近接しビアラホス耐性を付与する。次いで、本発明者らは、pK0101を保持するA. tumefaciens EHA105株

を用いて、Floral dip法により形質転換アラビドプシス植物体を作製した。pK0101の導入されたアラビドプシス植物体に対して、初期胚特異的プロモーターで働くFLPを保持する*A. tumefaciens* EHA105株を用いてFloral dip法を適用し、ピアラホス耐性を指標にして、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子が効率よく除去されるか否かを検討できる。

【0009】

また、この方法は、トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポズンを有する形質転換植物体から該トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポズンを転位する方法にも応用できるものと考えられる。

【0010】

即ち、本発明は、以下の〔1〕～〔6〕を提供するものである。

〔1〕部位特異的組換え酵素をコードするDNAを、部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAを有する形質転換植物体に、*Agrobacterium*を介して導入することにより、該部位特異的組換え酵素を一過的に発現させる工程を含む、該部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAの除去方法。

〔2〕〔1〕に記載の方法により、部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAが除去された形質転換植物体。

〔3〕トランスポゾン転位酵素をコードするDNAを、トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポズンを有する形質転換植物体に、*Agrobacterium*を介して導入することで、トランスポゾン転位酵素を一過的に発現させる工程を含む、該トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンの転位方法。

〔4〕〔3〕に記載の方法により、トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンが転位した形質転換植物体。

〔5〕〔2〕または〔4〕に記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体。

〔6〕〔2〕、〔4〕または〔5〕に記載の形質転換植物体の繁殖材料。

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明者らは、部位特異的組換え酵素をコードするDNAを、部位特異的組換え

酵素認識配列に挟まれたDNAを有する形質転換植物体に、Agrobacterium（アグロバクテリウム）を介して導入することにより、該部位特異的組換え酵素を一過的に発現させる工程を含む、該部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAの除去方法を提供する。この方法は、従来の方法と比較して、部位特異的組み換え酵素認識配列に挟まれたDNAを高効率に除去できる方法である。また、この方法は、組織培養を必要としないので従来の方法と比較して非常に簡便な方法である。さらに、この方法は、所望の植物に適用できると考えられ、その利用範囲は極めて広いと考えられる。

【0012】

本発明において、部位特異的組換え酵素とは、部位特異的組換えの過程、即ちDNAの分子内あるいは分子間の特定部位で起こる組換えの過程を触媒する酵素を意味する。また、部位特異的組み換え酵素認識配列とは、部位特異的組み換え酵素の認識配列である40塩基対程の配列を意味する。部位特異的組換え酵素は認識配列に挟まれたDNA断片を切り出し環状化させる機能を持つが、逆の反応（環状分子を認識配列を介して挿入する）も行う。

【0013】

本発明における部位特異的組換え酵素としては、特に制限はないが、例えばFR T配列を認識する出芽酵母由来のFLP recombinase、味噌醤油酵母（*Zygosaccharomyces rouxii*）由来のR/RSシステムにおけるRS配列を認識する酵素R（Onouchi H et al. (1995) Mol. Gen. Genet. 247, 653-660、Onouchi H et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19, 6373-6378）、bacteriophage P1由来のCre/loxシステムにおけるlox配列を認識する酵素Cre（Albert H et al. (1995) Plant J. 7, 649-659、Liu Q et al. (1998) Current Biol. 8, 1300-1309、Abmemski K et al. (1983) Cell 32, 1301-1311）などが例示できる。

【0014】

本発明において、部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAとしては、好ましくはマーカー遺伝子が挙げられるが、これに限定されるものではない。該マーカー遺伝子としては、特に制限はなく、カナマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ピアラヒス耐性遺伝子などの薬剤耐性遺伝子、GUS遺伝子、G

FP遺伝子などの蛍光遺伝子などが例示できる。

【0015】

また、本発明におけるAgrobacteriumとしては、特に制限はなく、例えば、Agrobacterium tumefaciens EHA105が例示できる。

【0016】

本発明における「部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAを有する形質転換植物体」は、例えば、部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させることで作製できる。

【0017】

本発明において、植物細胞の形質転換に用いられるベクターは、該細胞内で挿入DNAを発現させることが可能なものであれば特に制限はない。例えば、植物細胞内で恒常的に遺伝子を発現させるためのプロモーター（例えば、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター）を有するベクターや、外的な刺激により誘導的に活性化されるプロモーターを有するベクターを用いることもできる。ここで言う「植物細胞」には、種々の形態の植物細胞、例えば、懸濁培養細胞、プロトプラスト、葉の切片、カルスなどが含まれる。

【0018】

植物細胞へのベクターの導入には、ポリエチレングリコール法、電気穿孔法（エレクトロポレーション法）、アグロバクテリウムを介する方法、パーティクルガン法など、当業者に公知の種々の方法を用いることができる。パーティクルガン法においては、例えば、バイオラッド社のものを用いることが可能である。形質転換植物細胞からの植物体の再生は、植物細胞の種類に応じて当業者に公知の方法で行うことが可能である（Toki S, et al., Plant Physiol., 100: 1503, 1992）。

【0019】

例えば、イネにおいて形質転換植物体を作製する手法については、ポリエチレングリコールを用いてプロトプラストへ遺伝子導入し、植物体（インド型イネ品種が適している）を再生させる方法（Datta SK: In Gene Transfer To Plants (Potrykus I and Spangenberg, Eds) pp.66-74, 1995）、電気パルスによりプ

ロトプラストへ遺伝子導入し、植物体（日本型イネ品種が適している）を再生させる方法（Toki S, et al., Plant Physiol., 100: 1503, 1992）、パーティクルガン法により細胞へ遺伝子を直接導入し、植物体を再生させる方法（Christou P, et al., Biotechnology 9: 957, 1991）、およびAgrobacteriumを介して遺伝子を導入し、植物体を再生させる方法（例えば、単子葉植物の超迅速形質転換法（特許第3141084号））など、いくつかの技術が既に確立し、本願発明の技術分野において広く用いられている。本発明においては、これらの方法を好適に用いることができる。

【0020】

また、本発明における「部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAを有する形質転換植物体」は、例えば、後述の方法により、部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAを、intactな植物体に直接的に導入することで作製できる。

【0021】

本発明においては、このように作製された部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAを有する形質転換植物体に、部位特異的組換え酵素をコードするDNAを、Agrobacteriumを介して導入する。これによって、部位特異的組換え酵素が一過的に発現し、部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAが除去される。

【0022】

本発明において、部位特異的組み換え酵素認識配列に挟まれたDNAを有する形質転換植物体に、部位特異的組換え酵素をコードするDNAを、Agrobacteriumを介して導入する方法としては、in planta transformation法を好適に用いることができる。

【0023】

ここで、in planta transformation法とは、植物からカルス誘導やプロトプラスト単離等を行わずに、intactな植物体に直接遺伝子導入を行う方法を意味する。特にアラビドプシスで開発された方法は蕾の時期の植物体の花序をアグロバクテリウム菌液に浸すだけで形質転換を行う方法で極めて簡便な方法である（vacuum infiltration法の場合は浸した後に減圧処理を行う）。形質転換（遺伝子の導入）は卵細胞に対して行われると考えられており、自殖種子の0.1～0.5%が

形質転換種子となる。

【0024】

本方法は従来の方法と比べ組織培養を経ない形質転換法のため、somaclonal variation(体細胞突然変異)を誘発する可能性が低く、また操作が極めて簡便で形質転換体を得られるまでの期間が短いという利点がある。

【0025】

本発明において、in planta transformation法 (Bent A.W. Arabidopsis in Planta Transformation. Uses, Mechanisms, and Prospects for Transformation of Other Species. (2000) Plant Physiology 124, 1540-1547) としては、Floral dip法、vacuum infiltration法、Incision/Inoculation法、アグロバクテリウム菌液をスプレーして感染するFloral spray法 (Chung MH et al. (2000) Transgenic Res. 9(6) 471-476) などが例示できるが、これらに限定されるものではない。

【0026】

本発明において、部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAが除去されたか否かは、該DNAが薬剤耐性遺伝子や蛍光遺伝子であれば、部位特異的組換え酵素をコードするDNAが導入された形質転換植物体、該形質転換植物体の細胞、または、該形質転換植物体の種子などの薬剤耐性能の消失や蛍光の消失、また、サザン法、PCR法などで判断することができる。

【0027】

また、トランスポーゼス(転位酵素)が特異的な配列を認識してトランスポゾンを引き出す過程は部位特異的組み換え酵素がその認識配列を引き出す過程と類似していることから、本発明者らは、トランスポゾン転位酵素をコードするDNAを、トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンを有する形質転換植物体に、Agrobacteriumを介して導入することで、トランスポゾン転位酵素を一過的に発現させる工程を含む、該トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンの転位方法を提供する。

【0028】

トランスポゾンによる遺伝子のタギングは現在主として2成分系で行われている。

る。この方法はトランスポーゼスを持たないトランスポゾン（非自立的トランスポゾン）を有する植物体とトランスポーゼスが発現している植物体を交配して、非自立的トランスポゾンを転移させ、また、再度転移しない様に次世代でトランスポーゼス遺伝子を分離させる方法であり、多大な労力と時間を必要としている。これに対して本発明の方法はトランスポーゼスをコードするDNAを、非自立的トランスポゾンを有する植物体に、Agrobacteriumを介して導入することで、トランスポーゼスを一過的に発現させ、非自立的トランスポゾンを転移させる方法であり、高効率の転移が期待され、また、次世代でトランスポーゼス遺伝子を分離させる必要もない。

【0029】

本発明におけるトランスポゾン転位酵素としては、特に制限はないが、例えばトウモロコシのAc/Ds系が挙げられる。

【0030】

本発明における「トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンを有する形質転換植物体」は、例えば、トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させること、また、in planta transformation法により、トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンを植物体に導入することで作製できる。本発明においては、このように作製されたトランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンを有する形質転換植物体に、トランスポゾン転位酵素をコードするDNAを、Agrobacteriumを介して導入する。これによって、トランスポゾン転位酵素が一過的に発現し、トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンが転位する。

【0031】

部位特異的組み換え酵素認識配列に挟まれたDNAを有する形質転換植物体から該DNAが除去された形質転換植物体や、転位酵素を持たないトランスポゾンを有する形質転換植物体から該転位酵素を持たないトランスポゾンが転位した形質転換植物体がいったん得られれば、該植物体から有性生殖または無性生殖により子孫を得ることができる。また、該植物体やその子孫あるいはクローンから繁殖材料（例えば、種子、果実、切穂、塊茎、塊根、株、カルス、プロトプラストなど

)を得て、それらを基に該植物体を量産することも可能である。

【0032】

【実施例】

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

〔1〕 pK0101、FLP遺伝子一過的発現ベクターの作製

部位特異的組み換え酵素として出芽酵母由来のFLP recombinase (pOG44, Invitrogen) を用い、その認識配列であるFRT配列をハイグロマイシン抵抗性遺伝子カセット (CaMV35sプロモーター+ハイグロマイシン抵抗性遺伝子+CaMV35sターミネーター) の両外側に配置したコンストラクトを作製した(図1A)。このコンストラクトではFRT配列のさらに外側にはマンノピン合成酵素遺伝子のプロモーターとビアラホス耐性遺伝子を配置し、FLPの働きによりFRT配列に挟まれたハイグロマイシン抵抗性遺伝子カセットが抜けることにより、ビアラホス耐性遺伝子が発現する事が期待される(図2)。また、FLP遺伝子を発現させるために図1に示したバイナリーベクター(pSkl-1FLP)を作製した(図1B)。上記のベクターは *Agrobacterium tumefaciens* EHA105にエレクトロポレーション法により導入した。

【0033】

〔2〕 アラビドプシスの形質転換

pK0101を保持する *A. tumefaciens* EHA105を用いてFloral dip法 (Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998). Plant J. 16, 735-743.) により *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0 を形質転換した。得られた形質転換種子は20 mg/Lの濃度のハイグロマイシンを含む0.4% ゲルライトを固化剤としたMS培地 (Murashige, T. and Skoog, F. (1962) Physiol. Plant. 15, 473-497.) 上に播種し、ハイグロマイシンを含む培地上で生育してきた植物体を形質転換植物体の候補として実験に用いた。

【0034】

〔3〕 FLP遺伝子の一過的発現によるマーカー遺伝子の除去

〔2〕で得られたpK0101導入アラビドプシス形質転換植物体に対して、Floral

dip法によりpSkl-1FLPを保持する*A. tumefaciens* EHA105を感染させ FLP遺伝子を一過的に発現させる。FLP遺伝子の一過的発現によってFRT配列間⁸が切り出されると、ゲノム中に残されたmasプロモーターとbar遺伝子が連結し植物体はビアラホス耐性となる。従って、FLP遺伝子の一過的発現によってビアラホス耐性を示す植物体が効率よく得られたときに、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子が効率よく除去されたと判断される。

【0035】

【発明の効果】

本発明によって、部位特異的組み換え酵素認識配列に挟まれたDNAを有する形質転換植物体から該DNAを効率的かつ簡便に切り出し除去を行うことが可能となる。さらに、転位酵素を持たないトランスポゾン⁹を有する形質転換植物体から該転位酵素を持たないトランスポゾンを効率的かつ簡便に転位させることが可能となる。これらの方法は、所望の植物に適用できると考えられ、その利用範囲は極めて広いと考えられる。

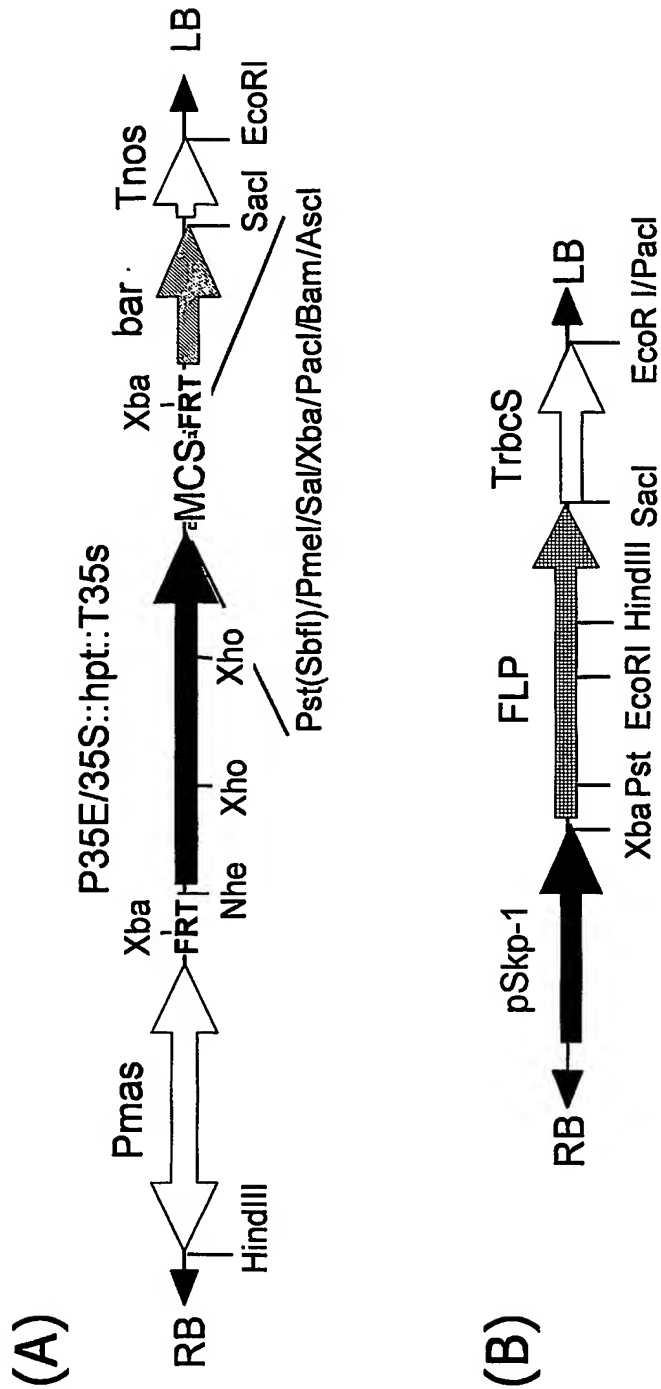
【図面の簡単な説明】

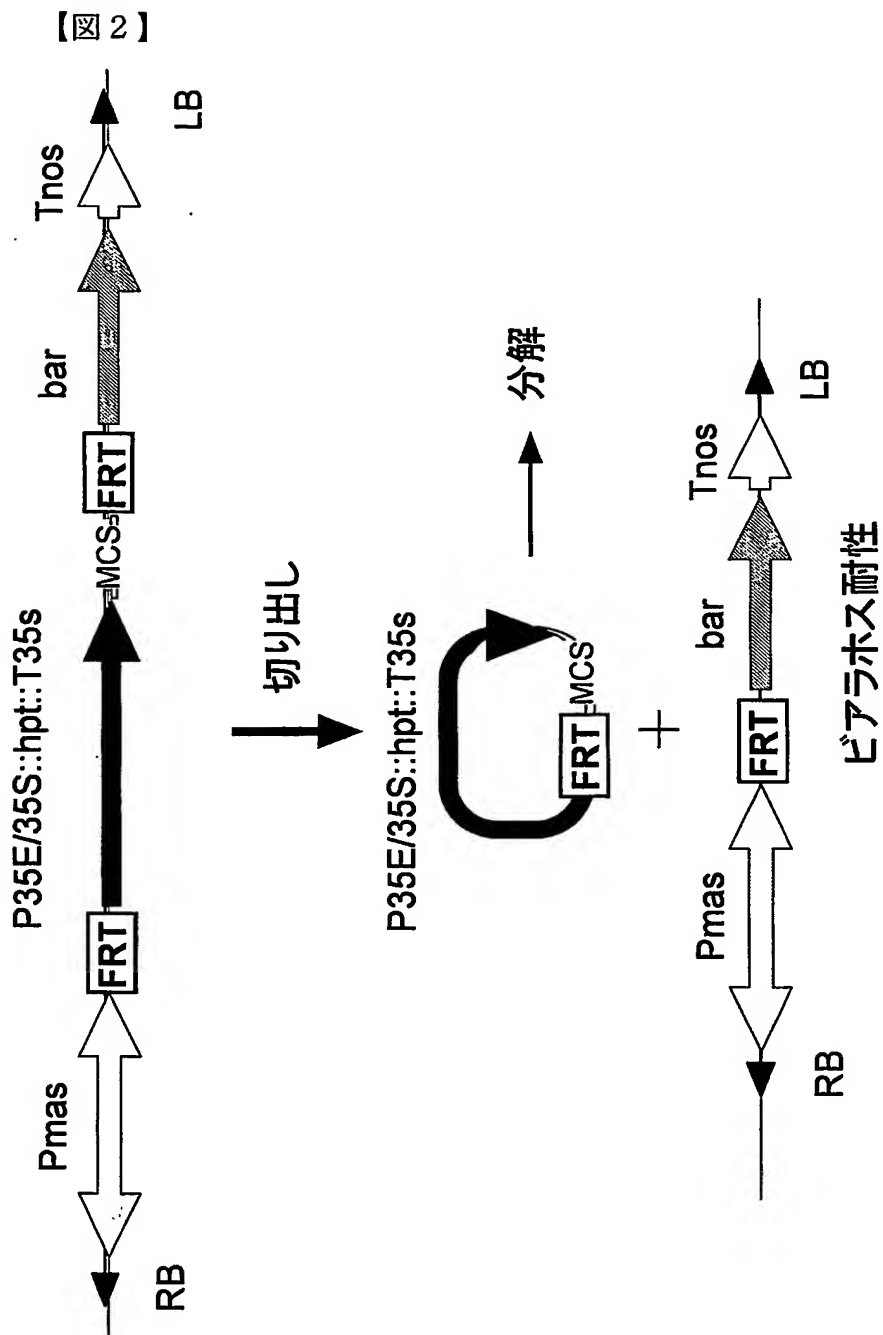
【図1】 本発明に用いたベクターを示す図である。(A)はpK0101を示し、(B)はpSkl-1-FLP (アラビドプシス用 FLP一過的発現用)を示す。

【図2】 FLPによるFRT配列間の切り出しを示す図である。FLPの一過的発現によってFRT配列間⁸が切り出されると、ゲノム中に残されたmasプロモーターとbar遺伝子が連結し植物体はビアラホス耐性となる。一方、切り出されたDNA断片は細胞中で複製できずに分解されハイグロマイシン耐性を失う。

【書類名】 図面

【図 1】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAを有する形質転換植物体から該DNAを効率的かつ簡便に除去する方法、および、トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンを有する形質転換植物体から該トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンを効率的かつ簡便に転位する方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 部位特異的組み換え酵素遺伝子をFloral dip法により一過的に高発現させることで、マーカー遺伝子を効率的かつ簡便に除去できるのではないかと考えた。この方法は、トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンを有する形質転換植物体から該トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンを転位する方法にも応用できるものと考えられる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 0 6 7 1 7 3
受付番号	5 0 3 0 0 4 0 4 5 0 6
書類名	特許願
担当官	兼崎 貞雄 6 9 9 6
作成日	平成 1 5 年 4 月 2 3 日

< 認定情報・付加情報 >

【手数料の表示】

【納付金額】 10,080円

次頁無

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）
【提出日】 平成16年 2月25日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2003- 67173
 【出願日】 平成15年 3月12日提出の特許願
【承継人】
 【識別番号】 501203344
 【氏名又は名称】 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構
【承継人代理人】
 【識別番号】 100102978
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 清水 初志
【承継人代理人】
 【識別番号】 100108774
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 橋本 一憲
【その他】 独立行政法人農業技術研究機構法の一部を改正する法律（平成14年12月4日法律第129号）附則第4条第1項に基づく承継。（なお、国が承継する資産についての政令は定めていない。）

【提出物件の目録】
 【物件名】 委任状 1

【事件の表示】
【発明の名称】 部位特異的組換え酵素遺伝子の一過性発現によるマーカー遺伝子の除去技術

【物件名】

委任状

【添付書類】

委 任 状

平成 16 年 2 月 25 日

私は、識別番号 100102978 弁理士 清水 初志
識別番号 100108774 弁理士 橋本 一憲
を以て代理人として下記事項を委任します。

別添一覧表に記載の名義変更及び特許権移転登録申請に関する手続

住所又は居所 茨城県つくば市観音台 3-1-1

氏名又は名称 独立行政法人 農業、生物系特定産業技術研究機構

代表者 理事長 三輪 春太郎



出願番号	発明の名称	出願日
特願平 10-61889 号	融合細胞株とその取得方法	1998/2/27
特願 2003-353137	融合細胞株	2003/10/14
特願 2000-674251	薬物代謝機能を持つ植物及びその用途	1999/3/26
特願平 10-310927 号	高純度 β -クリプトキサンチンの製造方法	1998/10/30
特願平 10-346646 号	抗アレルギー剤	1998/11/20
特願平 10-287999 号	環境ストレス耐性植物	1998/10/9
特願 2000-620104	アブシジン酸合成を制御する新規イネ遺伝子	2001/11/20
特願 2000-620098	エチレン合成を制御する新規イネ遺伝子	2001/11/20
特願 2000-620081	雌しべの各組織に特異的な活性を有するプロモーター	2001/11/20
特願 2001-635562	植物の感光性遺伝子およびその利用	2002/4/4
特願 2001-635563	植物の感光性遺伝子 Hd1 およびその利用	2002/4/4
特願平 11-330680 号	タバート属特異的ジंकフィンガー型転写因子の遺伝子を用いて花粉稔性を低下させる方法	1999/11/19
特願 2002-234201	タバート属特異的ジंकフィンガー型転写因子の遺伝子を用いて花粉稔性を低下させる方法(分割出願)	2002/8/9
特願 2003-110911	タバート属特異的ジंकフィンガー型転写因子の遺伝子を用いて花粉稔性を低下させる方法(分割出願)	2003/4/15
特願平 11-330681 号	花粉特異的ジंकフィンガー転写因子の遺伝子を用いて花粉稔性を低下させる方法	1999/11/19
特願 2002-234207	花粉特異的ジंकフィンガー転写因子の遺伝子を用いて花粉稔性を低下させる方法(分割出願)	2002/8/9
特願 2003-110912	花粉特異的ジंकフィンガー転写因子の遺伝子を用いて花粉稔性を低下させる方法(分割出願)	2003/4/15
特願 2000-41704	活性化酵素の不活性化方法	2000/2/18
特願 2000-071533	人工シャペロン用キット	2000/3/15
特願 2000-83067	葉の形状を制御する新規イネ遺伝子	2000/3/23
特願 2000-149106	ブラシノステロイド応答に関与する新規遺伝子	2000/5/19
特願 2000-195672	抗アレルギー剤	2000/6/29
特願 2000-266083	ベクターモノカリオンを用いた紫紋羽病菌に対する新規殺菌剤	2000/9/1
特願 2000-251606	外来遺伝子産物を植物の種子中に高度に蓄積させる方法	2000/8/22
特願 2000-286087	耐暑性の向上した形質転換植物及びその作出方法	2000/9/20
特願 2000-316330	近赤外分光法を用いた血液分析法および血液分析装置	2000/10/17
特願 2000-316331	近赤外分光法を用いた液状試料の分析法および分析装置	2000/10/17
特願 2000-313577	マイクロスフィアの製造方法および製造装置	2000/10/13
特願 2000-311295	イネ貯蔵タンパク質の発現を制御する bZIP 型転写因子	2000/10/11

④

出願番号	発明の名称	出願日
特願 2000-347924	動物の受精卵の共培養担体及びこの担体を用いる動物の受精卵の培養方法	2000/11/15
特願 2000-005221	ブロン分解系の抑制により植物のストレス耐性を上昇させる方法	2000/1/5
特願 2000-356839	植物の開花を誘導する遺伝子Hd3a およびその利用	2000/11/24
特願 2000-330542	MADS ボックス遺伝子を標的とした植物の花型の改良	2000/10/30
特願 2001-16569	病原性低下因子を含む白紋羽病菌分離株W370	2001/1/25
特願 2001-50208	豚回虫感染幼虫(Ascaris suum)の14KDa 抗原、それをコードする核酸分子及びそれらの利用	2001/2/26
特願 2001-134453	新規遺伝子	2001/5/1
特願 2002-216303	舌上皮前駆細胞の単離培養方法およびその分化誘導方法	2002/7/25
特願 2001-239980	塩ストレス耐性を制御する新規イネ遺伝子	2001/8/7
特願 2003-539411	フィトクロムCの発現制御による植物の開花時期の調節	2003/9/9
特願 2001-266001	単分散複合型エマルジョンの製造方法	2001/9/3
特願 2001-273689	米のDNA食味判定技術及び粳/玄米半粒による良食味米選抜方法	2001/9/10
特願 2001-277332	スターチシンターゼ I 型の機能解明と新規デンプン作出法	2001/9/12
特願 2001-284927	カイコ卵へのポリヌクレオチドの効率的導入方法	2001/9/19
特願 2001-285663	休眠卵を産生するカイコ品種へのポリヌクレオチドの導入方法	2001/9/19
特願 2001-284785	抗バミクソウイルス剤	2001/9/19
特願 2002-00796	豚回虫(Ascaris suum)感染幼虫の16KDa 抗原、それをコードする核酸分子及びそれらの利用	2002/1/7
特願 2002-28109	種子成熟後期及び発芽期特異的誘導生プロモーター	2002/2/5
特願 2002-145183	ブラシノリド応答性遺伝子およびその利用	2002/5/20
特願 2002-151627	病害抵抗性反応を制御する新規遺伝子とその利用	2002/5/24
特願 2002-153807	植物の開花時期を促進する Ehd1 遺伝子およびその利用	2002/5/28
特願 2002-215112	DNA脱塩基部位の検出方法	2002/7/24
特願 2002-243551	寄生虫の無機ピロホスファターゼ、それをコードする核酸分子及びそれらの利用	2002/8/23
特願 2002-252606	植物の開花促進遺伝子 RFT1 および植物の開花時期を予測する方法	2002/8/30
特願 2002-276051	新たな機能を持つジベレリン 2-酸化酵素遺伝子およびその利用	2002/9/20
特願 2002-276398	ブラシノステロイドの生合成に関与しているシトクロムP450モノオキシゲナーゼ遺伝子の改変および/または過剰発現による単子葉植物の形質の制御方法およびこの遺伝子を用いて改変された単子葉植物	2002/9/20

126

4

出願番号	発明の名称	出願日
特願 2002-289848	DNAの伸長固定方法	2002/10/2
特願 2002-289855	DNAを伸長、固定する方法	2002/10/2
特願 2002-301454	カイコを利用したタンパク質の製造方法	2002/10/16
特願 2002-301503	ウニ由来インスレーターを用いた遺伝子発現ベクター	2002/10/16
特願 2002-376108	DNA配列情報解析法	2002/12/26
特願 2003-053023	種子の休眠を維持する方法	2003/2/28
特願 2003-054495	マダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチドタンパク質、それをコードする核酸分子及びそれらの利用	2003/2/28
特願 2003-60616	ゲノムDNAの標的メチル化領域の脱メチル化法	2003/3/6
特願 2003-067173	部位特異的組換え酵素遺伝子の一過性発現によるマーカー遺伝子の除去技術	2003/3/12
特願 2003-067262	UVDE 発現による相同組換え頻度の向上	2003/3/12
特願 2003-092465	未分化細胞を選別する方法およびその利用	2003/3/28
特願 2003-098516	舌上皮由来細胞株KT-1及びその用途	2003/4/1
特願 2003-154226	アセチルコリンエステラーゼ活性を有するタンパク質、その精製方法および遺伝子	2003/5/30
特願 2001-35632	カタリピック酸及びまたはブニシク酸の合成に関する遺伝子	2001/2/13
特願 2001-174553	プロリン蓄積能力の高いイネ科植物およびその製造方法	2001/6/8
特願 2002-30655	植物の耐干性の簡易評価法	2002/2/7
特願 2002-53281	光スキャニング装置	2002/2/28
特願 2002-53282	微少領域光処理装置	2002/2/28
特願 2002-215940	中枢神経細胞突起再生剤及びその生理作用を有する高機能性製品	2002/7/25
特願 2002-223686	化学発光および蛍光の経時変化測定装置および方法	2002/7/29
特願 2002-271730	抗アレルギー成分を含有する機能性飲食品	2002/9/18
特願 2002-274742	人工漁場	2002/9/20
特願 2002-273438	trans-11-, cis-13-共役二重結合をもつ脂肪酸の合成に関与する遺伝子およびその利用	2002/9/19
特願 2002-294471	ダイアフラムを用いフィルタ機能を有するバルブ	2002/10/8
特願 2002-287423	土壌病害防除剤および土壌病害防除法	2002/10/10
特願 2002-305907	土壌病害防除剤および土壌病害防除法	2002/10/21
特願 2002-305824	DNA の変異導入法	2002/10/21
特願 2002-305896	特性を改変した蛋白質の作出方法	2002/10/21
特願 2002-320576	耐熱性コージビオースホスホリラーゼ	2002/11/1

3/6

5

出願番号	発明の名称	出願日
特願 2002-320569	高重合度オリゴ糖生成コージビオースホスホリラーゼ	2002/11/1
特願 2002-314333	塩基配列解析方法及び装置	2002/10/29
特願 2002-332090	植物の転写因子をコードする遺伝子	2002/11/15
特願 2002-347291	α -グルコシダーゼ遺伝子を含有する組換えベクター、形質転換体およびそれを用いた該の製造方法	2002/11/29
特願 2002-349716	細胞培養用セル	2002/12/2
特願 2003-080847	ストレス誘導性プロモーター及びその利用方法	2003/3/24
特願 2002-380936	小麦粉の製パン性の改良法と本法で得られるパン類	2002/12/27
特願 2002-380937	超強力小麦粉含有改質米粉とそれを用いた米粉食品	2002/12/27
特願 2002-380938	米粉パンの製造法と本法によって得られるパン類	2002/12/27
特願 2002-18018	低カフェインの茶葉からの抗アレルギー成分含有機能性飲食品	2003/1/27
特願 2002-18017	茶葉を原料とした抗アレルギー作用を有する機能性食品素材	2003/1/27
特願 2002-18019	抗アレルギー効果増強製造法及び本法を用いて製造された機能性飲食品	2003/1/27
特願 2003-033732	結晶1-kestose製造に用いる β -フルクトフラノシダーゼの選抜法	2003/2/12
特願 2003-063181	スフィンゴ脂質の判別法	2003/3/10
特願 2003-067049	イネ由来のストレス誘導性プロモーター	2003/3/12
特願 2003-069917	重金属蓄積能が強化された植物体	2003/3/14
特願 2003-69067	時間分解蛍光光解除法による分析方法及び装置	2003/3/14
特願 2003-69034	細胞の処理に用いるセル	2003/3/14
特願 2003-89363	静電マイクロバルブ及びポンプ	2003/3/27
特願 2003-051882	酵素活性測定方法、その方法に用いる固相及びその製造方法、酵素阻害剤の阻害能評価方法、並びに酵素活性測定用キット	2003/2/27
特願 2003-92827	組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官の生産方法及び新規組換えタンパク質	2003/3/28
特願 2003-124823	trans-11-, cis-13-共役二重結合をもつ脂肪酸の合成に関与する遺伝子およびその利用	2003/4/30
特願 2003-111246	新規 α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子	2003/4/16
特願 2003-224863	発泡ガラス製造方法	2002/8/1
特願 2001-587156	レタスピッグベインウイルスタンパク質をコードする核酸およびその利用	2002/11/11
特願 2001-152679	植物の Ran 遺伝子変異体、および該変異体を用いた植物の開花時期の促進方法	2001/05/22

A26

6

出願番号	発明の名称	出願日
特願 2001-358366	植物の胚特異的遺伝子および該遺伝子のプロモータ、並びにそれらの利用	2001/11/22
特願 2002-228576	キクにおける外来 DNA の発現のための EF1 α 遺伝子のプロモーターの利用	2002/08/06
特願 2002-209805	ミラフィオリダスウイルスタンパク質をコードする核酸およびその利用	2002/07/18
特願 2002-302280	アブラナ科植物根こぶ病に対する抵抗性遺伝子検出用マイクロサテライトマーカー、およびその利用	2002/10/16
特願 2002-371170	イグサの主要栽培品種識別マーカー	2002/12/20
特願 2002-350839	麦類植物の受粉性の識別方法とその利用による麦類植物の改良方法	2002/12/03

6/

7

特許名	特許番号	出願番号
昆虫由来のセルラーゼ遺伝子	特許第 3030349 号	特願平 9-206740 号
細胞壁溶解酵素遺伝子、該遺伝子を含むベクター及び形質転換体	特許第 2997800 号	特願平 9-343630 号
キシラナーゼ遺伝子、該遺伝子を含むベクター及び形質転換体	特許第 3366933 号	特願平 10-90702 号
マイクロスフィアの連続製造装置	特許第 3081880 号	特願平 10-083946 号
糸状菌及び細菌に対する溶菌活性を有するイネキシナーゼ相補 DNA 及び該相補 DNA を含むプラスミドを保有する形質転換体	特許第 3376453 号	特願平 10-123905 号
オーラブレン高含有ミカン科植物の作出法	特許第 2963967 号	特願平 10-208473 号
マイクロチャネル装置及び同装置を用いたエマルションの製造方法	特許第 3012608 号	特願平 10-262849 号
クロスフロー型マイクロチャネル装置及び同装置を用いたエマルションの生成または分離方法	特許第 2981547 号	特許平 10-187345 号
植物の転写因子をコードする遺伝子	特許第 3183458 号	特願平 10-228457 号
環境ストレス耐性植物	特許第 3178672 号	特願平 10-292348 号
アミノペプチターゼ前駆体をプロセッシングする酵素遺伝子、該遺伝子を含むベクター及び形質転換体	特許第 3030457 号	特願平 11-31118 号
単分散固体脂質マイクロスフィアの製造方法	特許第 3030364 号	特願平 11-78862 号
活性化リパーゼの製造方法および活性化リパーゼを用いた油脂の改質方法	特許第 3116060 号	特願平 11-78861 号
キシロースを生成しない改変キシラーゼ遺伝子、該遺伝子を含むベクター及び形質転換体	特許第 3030331 号	特願平 11-071715 号
病原性が低い紫紋羽病菌菌株分離株 V-70 およびそれを含む紫紋羽病防除剤	特許第 260062 号	特願平 11-260062 号
ダイズグリシニンを発現するトランスジェニック植物	特許第 3030339 号	特願平 10-223897 号
機能性エマルション	特許第 3448006 号	特願 2000-90441 号
可視および近赤外領域のスペクトル情報による哺乳動物の血漿成分の迅速測定法	特許第 3407006 号	特願 2000-364327
新規ペプチド、血圧降下剤および生理活性物質	特許第 3032822 号	特願平 10-323678 号
植物の細胞増殖因子前駆体ポリペプチド、増殖因子前駆体ポリペプチドをコードする遺伝子、植物の増殖促進方法	特許第 3038381 号	特願平 11-078612 号
タバコ由来の誘導性プロモーター構築	特許第 3236890 号	特願平 11-251615 号
乳成分連続測定装置	特許第 3268443 号	特願平 11-272825 号
マツタケ菌根の迅速人工合成法	特許第 3263730 号	特願平 11-357439 号

6/8

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-067173
受付番号	20400390577
書類名	出願人名義変更届 (一般承継)
担当官	兼崎 貞雄 6996
作成日	平成16年 4月19日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】

501203344

【住所又は居所】

茨城県つくば市観音台3-1-1

【氏名又は名称】

独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構
申請人

【承継人代理人】

【識別番号】

100102978

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6
階 清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

清水 初志

【承継人代理人】

申請人

【識別番号】

100108774

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6
階 清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

橋本 一憲

【提出された物件の記事】

【提出物件名】

委任状 (代理権を証明する書面) 1

特願 2003-067173

ページ: 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[501167644]

1. 変更年月日

2001年 4月24日

[変更理由]

新規登録

住 所

茨城県つくば市観音台2丁目1-2

氏 名

独立行政法人農業生物資源研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000195568]

1. 変更年月日

2001年 5月15日

[変更理由]

住所変更

住 所

埼玉県さいたま市日進町1丁目40番地2

氏 名

生物系特定産業技術研究推進機構

2. 変更年月日

2003年 4月22日

[変更理由]

住所変更

住 所

埼玉県さいたま市北区日進町1丁目40番地2

氏 名

生物系特定産業技術研究推進機構

出願人履歴情報

識別番号

[501203344]

1. 変更年月日

[変更理由]

住所

氏名

2001年 5月22日

新規登録

茨城県つくば市観音台3-1-1

独立行政法人 農業技術研究機構

2. 変更年月日

[変更理由]

住所

氏名

2003年10月 1日

名称変更

茨城県つくば市観音台3-1-1

独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.